

534,182

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年5月27日 (27.05.2004)

PCT

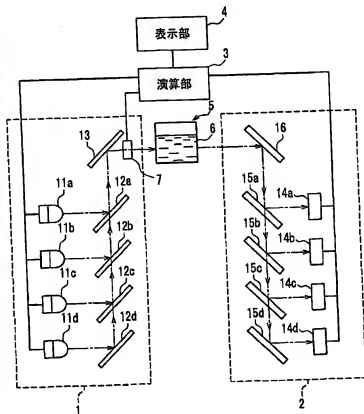
(10) 国際公開番号  
WO 2004/044564 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 21/64
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014421
- (22) 国際出願日: 2003年11月13日 (13.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-330787  
2002年11月14日 (14.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中嶋 真也 (NAKA-JIMA, Shiya) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

[続表]

(54) Title: MEASURING INSTRUMENT AND FLUOROMETRIC METHOD

(54) 発明の名称: 測定装置及び蛍光測定方法



4...DISPLAY UNIT  
3...CALCULATION UNIT

(57) Abstract: A measuring instrument comprising a light source unit (1) capable of emitting lights of different wavelengths, a light-receiving unit (2) which outputs an electric signal corresponding to the intensity of a transmitted light or an emitted light from a sample (6) in which a plurality of coloring matters are mixed, and a calculation unit (3) is used. The calculation unit (3) calculates the fluorescence intensity of the transmitted light or the emitted light with respect to each coloring matter using correction coefficients that are calculated in advance. The correction coefficients are calculated using the electric signals which are respectively outputted from the light receiving unit (2) when a plurality of correction samples, each of which contains one of the coloring matters that is different from those contained in the other correction samples, are respectively irradiated with lights of different wavelengths.

(57) 要約: 波長の異なる光を照射可能な光源ユニット1と、複数の色素が混合された試料6からの透過光又は放射光の強度に応じた電気信号を出力する受光ユニット2と、演算部3とを有する測定装置を用いる。演算部3は予め算出した補正係数を用いて、透過光又は放射光の蛍光強度を色素毎に算出する。補正係数は、色素のいずれか一つが混合され、混合された色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、波長の異なる光を照射したときに、受光ユニット2が出力する電気信号に基づいて算出する。

WO 2004/044564 A1



SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特  
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ  
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 測定装置及び蛍光測定方法

## 技術分野

- 本発明は、複数の色素が混合された試料に、各色素に対応する波長の
- 5 光を照射した場合における、色素毎の透過光又は放射光の強度を測定する測定装置に関し、特に、複数の蛍光色素が混合された試料に、各蛍光色素の励起波長の光を照射し、この光によって励起された蛍光を測定する蛍光測定装置及び蛍光測定方法に関する。

## 10 背景技術

- 近年、蛍光測定、吸光度測定、又は反射率測定を用いて、各種の成分分析や遺伝子診断等が行なわれている。例えば、蛍光測定を用いた成分分析では、色素（蛍光色素）を混合した試料に光を照射し、この光により励起された蛍光の蛍光強度を測定することによって、色素（蛍光色素）が標識された物質が検出される。

- 15 吸光度測定を用いた成分分析では、例えば、特開平 9-21749 号公報に開示されているように、色素を混合した試料に、色素に対応した波長の光を照射し、このときの透過光の強度を測定して吸光度を算出することにより、色素が標識された物質が検出される。反射率測定を用いた成分分析では、透過光の代わりに散乱光の強度を測定して反射率を算出することにより、色素が標識された物質が検出される。

また、このような成分分析によって複数の物質を検出する場合は、検出対象となる物質に応じて、種類の異なる複数の色素が試料に混合され、各色素に対応する光が別々に試料に照射される。

蛍光測定を用いる場合では、例えば、特表 2000-503774 号  
公報に開示されているように、励起波長及び蛍光波長がそれぞれ異なる  
複数の色素（蛍光色素）が混合された試料に、各色素の励起波長の光を  
別々に照射し、色素毎の蛍光強度を測定することによって成分分析が行  
5   なわれる。

また、吸光度測定を用いる場合では、吸収波長がそれぞれ異なる複数の  
の色素が混合された試料に、各色素の吸収波長の光を別々に照射し、透  
過光の強度を色素毎に測定することによって成分分析が行なわれる。

しかしながら、通常、色素の励起波長や吸収波長、反射波長はある程  
10   度の幅を有している。このため、蛍光測定を用いる場合は、使用されて  
いる色素（蛍光色素）間で励起ピーク波長が近接していると、ある色素  
がその励起波長の光によって励起したときに、他の色素まで励起してし  
まう場合がある。この場合、得られる蛍光強度は、励起した各色素の蛍  
光強度の合成値となってしまう、正確な成分分析や遺伝子診断等を行な  
15   うのが困難となる。

また、吸光度測定や反射測定を用いる場合であっても同様であり、得  
られる透過光や散乱光の強度が、各色素の透過光や散乱光の強度の合成  
値となり、正確な成分分析や遺伝子診断等を行なうのが困難となる。

本発明の目的は、透過光や放射光の強度の合成値から色素毎の実際の  
20   強度を分離して測定できる測定装置及び蛍光測定方法を提供すること  
にある。

#### 発明の開示

上記目的を達成するために本発明にかかる測定装置は、複数の色素が  
25   混合された試料に波長の異なる光を照射したときの透過光又は放射光の  
強度を前記色素毎に測定する測定装置であって、波長の異なる光を前記

試料に照射可能な光源ユニットと、前記透過光又は前記放射光を受光し、  
受光した光の強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットと、演算部  
とを有し、前記演算部は、前記複数の色素のいずれか一つが混合され、  
且つ、混合された色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対し  
5 て、前記光源ユニットによって波長の異なる光を照射したときに前記受  
光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、  
前記透過光又は前記放射光の強度を前記色素毎に算出することを特徴と  
する。

また、本発明にかかる測定装置は、前記試料に、前記色素として励起  
10 波長の異なる複数の蛍光色素が混合されており、前記受光ユニットが、  
前記蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じ  
た電気信号を出力し、前記演算部が、前記複数の蛍光色素のいずれか一  
つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用  
試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって前記複数の蛍光色素  
15 それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する  
電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記試料から放射さ  
れる蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する態様であっても良い。  
この態様においては、本発明にかかる測定装置は蛍光測定装置として機  
能する。

20 また、蛍光測定装置として機能する態様においては、前記試料に混合  
される前記複数の蛍光色素に  $1 \sim n$  の番号を付し、前記光源ユニットが  
 $k$  ( $1, 2, \dots, n$ ) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射し  
たときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を  $X_k$ 、前  
記  $k$  番の蛍光色素の蛍光強度を  $Y_k$  としたときに、前記補正係数が下記  
25 式 (1) を満たす行列 ( $a_{ij}$  ( $i = 1, 2, \dots, n; j = 1, 2, \dots, n$ )) であり、前記演算部は、下記式 (1) に前記行列 ( $a_{ij}$ ) と前記

出力値  $X_1 \sim X_n$  とを代入して、前記蛍光強度  $Y_1 \sim Y_n$  を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出するのが好ましい態様である。

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \dots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \dots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \dots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \dots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix} \quad \dots \dots \dots (1)$$

- 5 更に、蛍光測定装置として機能する態様においては、前記光源ユニットが照射する光の光量を検出して前記演算部に信号を出力する光量モニタを有し、前記演算部は、前記光量モニタが出力した信号に基づいて、前記出力値  $X_1 \sim X_n$  又は行列要素  $a_{11} \sim a_{nn}$  を補正するのも好ましい態様である。
- 10 次に、上記目的を達成するために本発明にかかる蛍光測定方法は、波長の異なる光を照射可能な光源ユニットと、蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットとを用いて、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を測定する蛍光測定方法であって、補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する工程を有し、前記補正係数は、前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって、前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて、算出されたものであることを特徴とする。
- 20

- 上記本発明にかかる蛍光測定方法においては、前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に1～nの番号を付し、前記光源ユニットがk（1, 2, …, n）番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を $X_k$ 、前記k番の
- 5 蛍光色素の蛍光強度を $Y_k$ としたときに、前記補正係数が上記式（1）を満たす行列（ $a_{ij}$ （ $i=1, 2, \dots, n$ ； $j=1, 2, \dots, n$ ））であり、上記式（1）に前記行列（ $a_{ij}$ ）と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出するのが好ましい態様である。
- 10 更に、上記本発明にかかる蛍光測定方法においては、前記光源ユニットが照射した光の光量に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正するのが好ましい態様である。
- また、本発明は、上記の本発明にかかる蛍光測定方法を具現化するためのプログラムであっても良い。このプログラムをコンピュータにイン
- 15 ストールして実行することにより、本発明にかかる蛍光測定方法を実行できる。なお、本明細書において、「色素」には、吸光度測定や反射率測定で用いられる色素に加え、蛍光測定で用いられる蛍光色素も含まれる。「色素」のうち蛍光色素のみを意味する場合は「蛍光色素」とする。
- 20 図面の簡単な説明
- 図1は、本発明の測定装置の一態様である蛍光測定装置を示す構成図である。
- 図2は、図1に示す蛍光測定装置で行なわれる蛍光測定処理を示すフローチャートである。
- 25 図3は、図1に示す蛍光測定装置で行なわれる補正係数算出処理を示すフローチャートである。

図 4 は、図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる光量補正值算出処理を示すフローチャートである。

発明を実施するための最良の形態

- 5 以下、本発明の測定装置及び蛍光測定方法の一例について図面を参照しながら説明する。なお、以下においては、本発明の測定装置が蛍光測定装置である例について説明している。先ず、本発明の測定装置の一態様である蛍光測定装置の構成について図 1 を用いて説明する。図 1 は、本発明の測定装置の一態様である蛍光測定装置を示す構成図である。
- 10 図 1 に示す蛍光測定装置は、試料 6 から放射される蛍光の蛍光色素毎の蛍光強度を測定する装置である。図 1 に示すように、蛍光測定装置は、光源ユニット 1、受光ユニット 2、演算部 3、表示部 4、反応容器 5 及び光量モニタ 7 を備えている。

反応容器 5 には、複数の蛍光色素が混合された試料 6 が添加される。

- 15 図 1 の例では、試料には下記の表 1 に示す 4 種類の蛍光色素が混合されている。なお、本発明において試料に混合される蛍光色素は下記の表 1 に示すものに限定されず、その数も限定されるものではない。本発明では、蛍光測定の目的等に応じて、必要な数の適切な蛍光色素を選択できる。

20 (表 1)

蛍光色素名	FAM	JOE	TAMRA	ROX
励起ピーク波長 [nm]	4 7 0	5 0 0	5 3 0	5 6 0
蛍光ピーク波長 [nm]	5 2 0	5 5 0	5 8 0	6 1 0



光源ユニット 1 は、波長の異なる光を照射可能に構成されており、試料に混合される蛍光色素の励起波長の光を照射することができる。図 1 の例では、光源ユニット 1 は、発光素子 11 a ~ 11 d と、ダイクロイックミラー 12 a ~ 12 d と、全反射ミラー 13 とを備えている。

- 5 発光素子 11 a ~ 11 d は、演算部 3 の指示に応じて発光し、試料 6 に混合された蛍光色素を励起させるための光を出射する。発光素子 11 a ~ 11 d は、各発光素子の出射方向が平行となるように配置されている。発光素子 11 a ~ 11 d が出射する光の波長は、互いに異なっており、試料に混合されている蛍光色素のいずれかの励起波長に設定されている。具体的には、発光素子 11 a は F A M の励起波長の光を、発光素子 11 b は J O E の励起波長の光を、発光素子 11 c は T A M R A の励起波長の光を、発光素子 11 d は R O X の励起波長の光を出射する。

- 10 ダイクロイックミラー 12 a ~ 12 d は、特定波長以下の波長の光だけを反射する（ハイパス）特性を有しており、ダイクロイックミラー 12 a、12 b、12 c、12 d の順で、反射可能な光の最大波長が大きくなっている。

- このため、発光素子 11 a ~ 11 d それぞれから出射された光は、同一の光路を通して全反射ミラー 13 に入射し、これに反射されて反応容器 5 に入射する。また、発光素子 11 a ~ 11 d が出射した光の光量は、  
20 光量モニタ 7 によってモニタされる。光量モニタ 7 は、発光素子 11 a ~ 11 d が出射した光の光量を検出して、演算部 3 に信号を出力する。

- なお、図 1 の例では、使用される蛍光色素が上述したように 4 種類であるため、光源ユニット 1 を構成する発光素子の数も 4 つである。また、発光素子の数に合わせてダイクロイックミラーの数も 4 つである。但し、  
25 本発明においては、発光素子及びダイクロイックミラーの数はこれに限定されず、使用される蛍光色素の数に応じて決定される。また、発光素

子 11 a ~ 11 d としては、発光ダイオードや半導体レーザを用いるのが好ましいが、キセノンランプやハロゲンランプを用いることもできる。

受光ユニット 2 は、反応容器 5 から放出された蛍光を受光し、受光した蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する。図 1 の例では、受光ユニットは、受光素子 14 a ~ 14 d と、ダイクロイックミラー 15 a ~ 15 d と、全反射ミラー 16 とを備えている。

図 1 の例では、ダイクロイックミラー 15 a ~ 15 d は、特定波長以上の波長の光だけを反射する（ローパス）特性を有したものであり、ダイクロイックミラー 15 d、15 c、15 b、15 a の順で、反射可能な光の最小波長が大きくなっている。受光素子 14 a ~ 14 d は、フォトダイオードであり、一のダイクロイックミラーの反射光が一の受光素子の受光面（図示せず）に入射するように配置されている。

このため、反応容器 5 から放射された蛍光は、全反射ミラー 16 で反射された後、その波長に応じてダイクロイックミラー 15 a ~ 15 d のいずれかで反射され、対応する受光素子に入射することになる。この結果、各受光素子から、蛍光の蛍光強度に応じた電気信号が演算部 3 に出力される。

演算部 3 は、受光ユニット 2 から出力された電気信号に基づいて蛍光強度を算出する。算出された結果は、表示部 4 に表示される。表示部 4 は、液晶表示装置や CRT 等である。

次に、本発明の蛍光測定方法について図 2 ~ 図 4 を用いて説明する。なお、本発明の蛍光測定方法は、図 1 に示す蛍光測定装置を動作させることによって実行することができる。このため、以下の説明では、図 1 に示す蛍光測定装置の動作について説明する。

図 2 は、図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる蛍光測定処理を示すフローチャートである。図 2 に示すように、最初に、蛍光測定装置の演算

部 3 は、補正係数が算出されているかどうか判定する（ステップ S 1）。補正係数は、複数の蛍光色素が混合された試料に各蛍光色素の励起波長の光を照射したときに受光ユニット 2 が出力する電気信号から、蛍光色素毎の蛍光強度を算出するための係数である。

- 5     なお、本発明における「蛍光色素毎の蛍光強度」とは、従来の蛍光測定で得られる合成値を言うのではなく、試料に光を照射したときに、その光の波長と励起波長が一致する蛍光色素が放射する蛍光のみの蛍光強度をいう。即ち、本発明においては、後述するように上記の補正係数を用いることで、合成値から実際の蛍光強度を分離している。
- 10    図 2 の例では、補正係数は上記式（1）を満たす行列（ $a_{ij}$ ）である。但し、本例では、上記したように試料に混合される蛍光色素は 4 種類である。このため、試料に混合される 4 種類の蛍光色素に、励起波長の短い順に 1～4 の番号を付し、光源ユニット 1 が  $k$ （1, 2, 3, 4）番の蛍光色素の励起波長の光を試料に照射したときに受光ユニット 2 が出力する電気信号の出力値を  $X_k$ 、 $k$  番の蛍光色素の蛍光強度を  $Y_k$  とする
- 15    と、補正係数は下記式（2）を満たす行列（ $a_{ij}$ （ $i = 1, 2, 3, 4$ ； $j = 1, 2, 3, 4$ ））となる。

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \end{bmatrix} \quad \dots\dots(2)$$

- 20    ステップ S 1 において補正係数が未だ算出されていないと判断した場合は、演算部 3 は補正係数算出処理を行ない（ステップ S 2）、その後、以下のステップ S 3 を実行する。なお、ステップ S 2 の補正係数算出処理の具体的な内容については、後述する。

一方、ステップ S 1 において補正係数が算出されていると判断した場合は、演算部 3 は、発光素子 1 1 a ~ 1 1 d それぞれから光を出射させて光量モニタ 7 によって光量を測定し、測定した光量に変動があった場合は、後述の出力値  $X_1 \sim X_4$  を補正するための光量補正值を算出する (ステップ S 3)。なお、ステップ S 3 の具体的な内容については、後述する。

次に、演算部 3 は、蛍光強度を測定するため、光源ユニット 1 の各発光素子に試料への励起波長の光の照射を行なわせる (ステップ S 4)。次いで、演算部 3 は、受光ユニット 2 が出力する電気信号を受信し、その出力値  $X_k$  ( $k = 1 \sim 4$ ) を取得する (ステップ S 5)。

なお、図 1 ~ 図 4 の例においては、受光ユニット 2 から出力された電気信号の出力値は、受光素子 1 4 a ~ 1 4 d が出力した電気信号の電流値を  $I / V$  変換し、これによって得られた電圧値を更に  $A / D$  変換して得られるデジタル値であるが、本発明はこれに限定されるものではない。受光ユニット 2 から出力された電気信号の出力値は、受光素子 1 4 a ~ 1 4 d が出力した電気信号の電流値を  $A / D$  変換して得られるデジタル値であっても良い。

その後、演算部 3 は、出力値  $X_1 \sim X_4$  を全て取得しているかどうか判定する (ステップ S 6)。出力値  $X_1 \sim X_4$  を全て取得していない場合は、演算部 3 は、再度ステップ S 4 及び S 5 を実行する。

一方、出力値  $X_1 \sim X_4$  を全て取得している場合は、演算部 3 は、補正係数とステップ S 5 で取得した出力値  $X_1 \sim X_4$  とを上記式 (2) に代入して、各蛍光色素の蛍光強度  $Y_1 \sim Y_4$  を算出する (ステップ S 7)。なお、ステップ S 3 において光量補正值が算出されている場合は、光量補正值によって補正した出力値  $X_1 \sim X_4$  又は行列 ( $a_{ij}$  ( $i = 1, 2, 3, 4; j = 1, 2, 3, 4$ )) の行列要素を上記式 (2) に代入する。

以上により、蛍光測定処理が終了し、蛍光色素毎の蛍光強度が表示部 4 に表示される。このように、本発明の蛍光測定装置及び蛍光測定方法を用いれば、合成値から実際の蛍光強度を分離できるので、従来に比べて正確な蛍光測定を行なうことができる。

- 5 次に、図 3 を用いて、図 2 のステップ S 2 で示した補正係数算出処理について説明する。図 3 は、図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる補正係数算出処理を示すフローチャートである。

補正係数算出処理は、複数の補正用試料を用いて行なわれる。補正用試料は、試料に混合される蛍光色素のうちの一つのみが混合されたものであり、各補正試料には互いに異なる蛍光色素が混合されている。つまり、図 3 の例では、表 1 で示したように 4 種類の蛍光色素が試料に混合されるため、補正用試料も 4 種類必要である。

また、補正係数算出処理は、上記式 (2) を展開して得られる下記の式 (3) ~ (6) を用いて行なわれる。

$$15 \quad a_{11}Y_1 + a_{12}Y_2 + a_{13}Y_3 + a_{14}Y_4 = X_1 \dots \dots (3)$$

$$a_{21}Y_1 + a_{22}Y_2 + a_{23}Y_3 + a_{24}Y_4 = X_2 \dots \dots (4)$$

$$a_{31}Y_1 + a_{32}Y_2 + a_{33}Y_3 + a_{34}Y_4 = X_3 \dots \dots (5)$$

$$a_{41}Y_1 + a_{42}Y_2 + a_{43}Y_3 + a_{44}Y_4 = X_4 \dots \dots (6)$$

図 3 に示すように、最初に、演算部 3 は、補正用試料に各発光素子が 20 ら光を照射し (ステップ S 1 1)、更に、このとき受光ユニット 2 が出力した電気信号の出力値を取得する (ステップ S 1 2)。次いで、演算部 3 は、この取得した出力値を上記式 (3) ~ (6) に代入する (ステップ S 1 3)。

次に、演算部 3 は、全ての補正用試料について出力値を取得できたかどうか判定する (ステップ S 1 4)。全ての補正用試料について出力値 25 が取得できていない場合は、再度ステップ S 1 1 ~ S 1 3 を実行する。

全ての補正用試料について出力値が取得できている場合は、ステップ S 15 を実行する。

- ステップ S 11 ~ S 13 を具体的に説明する。演算部 3 は、まず、1 番の蛍光色素 (FAM) のみが混合された補正用試料に、光源ユニット 5 1 によって 1 番 ~ 4 番の蛍光色素の励起波長の光を照射する。このとき出力された電気信号の出力値を蛍光色素の名称に対応させて F 1 ~ F 4 とすると、演算部 3 は、上記式 (3) ~ (6) の  $X_1 \sim X_4$  に、出力値 F 1 ~ F 4 を代入する。また、この場合、補正用試料には 1 番の蛍光色素しか混合されていないので、上記式 (3) ~ (6) において  $Y_2 = Y_3 =$  10  $Y_4 = 0$  (ゼロ) となる。よって、下記式 (7) ~ (10) が得られる。

$$a_{11}Y_1 = F1 \dots \dots (7)$$

$$a_{21}Y_1 = F2 \dots \dots (8)$$

$$a_{31}Y_1 = F3 \dots \dots (9)$$

$$a_{41}Y_1 = F4 \dots \dots (10)$$

- 15 同様に、演算部 3 は、2 番の蛍光色素 (JOE) のみが混合された補正用試料、3 番の蛍光色素 (TAMRA) のみが混合された補正用試料、及び 4 番の蛍光色素 (ROX) のみが混合された補正用試料それぞれについても、光源ユニット 1 によって 1 番 ~ 4 番の蛍光色素の励起波長の光を照射し、出力される電気信号の出力値を取得し、取得した出力値を 20 式 (3) ~ (6) に代入する。なお、これらの場合の出力値を、それぞれ J 1 ~ J 4、T 1 ~ T 4、R 1 ~ R 4 とすると、下記式 (11) ~ (22) が得られる。

$$a_{12}Y_2 = J1 \dots \dots (11)$$

$$a_{22}Y_2 = J2 \dots \dots (12)$$

$$25 \quad a_{32}Y_2 = J3 \dots \dots (13)$$

$$a_{42}Y_2 = J4 \dots \dots (14)$$

$$a_{13}Y_3 = T1 \cdots \cdots (15)$$

$$a_{23}Y_3 = T2 \cdots \cdots (16)$$

$$a_{33}Y_3 = T3 \cdots \cdots (17)$$

$$a_{43}Y_3 = T4 \cdots \cdots (18)$$

$$5 \quad a_{14}Y_4 = R1 \cdots \cdots (19)$$

$$a_{24}Y_4 = R2 \cdots \cdots (20)$$

$$a_{34}Y_4 = R3 \cdots \cdots (21)$$

$$a_{44}Y_4 = R4 \cdots \cdots (22)$$

次に、ステップS15において、演算部3は、ステップS13で得られた上記式(7)～(22)を用いて、上記式(2)を満たす行列( $a_{ij}$  ( $i=1, 2, 3, 4; j=1, 2, 3, 4$ ))を補正係数として算出する。

具体的には、演算部3は、 $a_{11}=a_{22}=a_{33}=a_{44}=1$ に設定して補正係数の算出を行なう。例えば、 $a_{11}:a_{12}:a_{13}:a_{14}$ の比は、  
 15 使用される蛍光色素によって決定されるため、演算部3は、 $a_{12}=J1/F1$ 、 $a_{13}=T1/F1$ 、 $a_{14}=R1/F1$ と算出する。

同様に、演算部3は、 $a_{21}=F2/J2$ 、 $a_{23}=T2/J2$ 、 $a_{24}=R2/J2$ と算出する。また、演算部3は、 $a_{31}=F3/T3$ 、 $a_{32}=J3/T3$ 、 $a_{34}=R3/T3$ と算出する。更に、演算部は、  
 20  $a_{41}=F4/R4$ 、 $a_{42}=J4/R4$ 、 $a_{43}=T4/R4$ と算出する。

以上により補正係数算出処理は終了する。なお、本発明において、補正係数算出処理は、蛍光測定装置の製品出荷前に行なうこともできる。この場合は、製品の出荷段階において、予め蛍光測定装置のメモリに補正係数を格納させた状態とするのが好ましい。また、この場合は、  
 25 示した蛍光測定処理において、ステップS1及びS2は実行しなくて良い。

次に、図 2 のステップ S 3 で示した光量に基づく出力値の補正について図 4 を用いて説明する。図 4 は、図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる光量補正值算出処理を示すフローチャートである。

図 4 に示す光量補正值算出処理は、発光素子 1 1 a ~ 1 1 d の光量が、  
 5 経時変化や環境変化によって変動すると、 $a_{11} : a_{21} : a_{31} : a_{41}$  の比、 $a_{12} : a_{22} : a_{32} : a_{42}$  の比、 $a_{13} : a_{23} : a_{33} : a_{43}$  の比、及び  $a_{14} : a_{24} : a_{34} : a_{44}$  の比が影響を受け、正確な蛍光輝度が算出できなくなるのを防止するために行なわれる。

具体的には、図 4 に示すように、演算部 3 は、最初に、補正係数を決定した時の発光素子 1 1 a、1 1 b、1 1 c 及び 1 1 d の光量比を 1 : 1 : 1 : 1 (基準値) とした場合における現在の発光素子の光量比を、  
 10 光量モニタからの信号に基づいて測定する (ステップ S 2 1)。

次に、演算部 3 は、算出した光量比が 1 : 1 : 1 : 1 から変動しているかどうかを判定する (ステップ S 2 2)。変動していない場合は、演  
 15 算部 3 は処理を終了する。一方、変動している場合は、変動幅に応じた光量補正值を算出する (ステップ S 2 3)。

例えば、発光素子 1 1 a、1 1 b、1 1 c 及び 1 1 d の光量比が 1 : 2 : 3 : 4 になっているとする。このとき、光量比を基準値に戻すには、各発光素子の光量をそれぞれ (1/1) 倍、(1/2) 倍、(1/3)  
 20 倍、(1/4) 倍とする必要があるので、光量補正值は (1/1)、(1/2)、(1/3)、(1/4) となる。なお、受光素子 1 4 a ~ 1 4 d の感度が低い場合は、光量の変動が蛍光強度に与える影響は小さくなり、感度が高い場合は、その逆となる。よって、光量補正值は、受光素子 1 4 a ~ 1 4 d の感度を考慮して決定するのが好ましいと言える。

25 よって、演算部 3 は、図 2 のステップ S 7 において、上記式 (2) の  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  及び  $X_4$  の代わりに、(1/1)  $X_1$ 、(1/2)  $X_2$ 、



(1/3)  $X_3$ 、及び (1/4)  $X_4$  を代入して、蛍光強度  $Y_1 \sim Y_4$  を算出する。または、演算部 3 は、上記式 (2) を満たす行列 ( $a_{ij}$  ( $i = 1, 2, 3, 4; j = 1, 2, 3, 4$ )) の行列要素  $a_{11}$ 、 $a_{12}$ 、 $a_{13}$ 、及び  $a_{14}$  の代わりに、(1/1)  $a_{11}$ 、(1/2)  $a_{12}$ 、(1/3)  $a_{13}$ 、(1/4)  $a_{14}$  を代入して、蛍光強度  $Y_1 \sim Y_4$  を算出する。

このように、図 1 に示す蛍光測定装置及び蛍光測定方法によれば、発光素子の光量の変動した場合であっても、発光素子の光量を補正して蛍光強度を算出できるので、蛍光測定の精度をよりいっそう向上させることができる。

なお、図 1 に示す蛍光測定装置は、光源ユニット 1 及び受光ユニット 2 と接続されたコンピュータに、図 2 に示したステップ S1 ~ S7 を具現化するプログラムをインストールし、このプログラムを実行することによって実現することができる。この場合、コンピュータの CPU (central processing unit) は演算部 3 として機能する。

上記の実施の形態では、蛍光測定装置及び蛍光測定方法を例に挙げて説明している。但し、本発明はこの例に限定されるものではなく、吸光度測定や反射率測定を用いた測定装置や測定方法であっても良い。つまり、本発明によれば、吸収波長又は反射波長の異なる複数の色素が試料に混合されている場合であっても、上記に示したと同様にして補正係数を算出でき、透過光又は散乱光の強度を色素毎に算出できる。また、この算出された透過光の強度から吸光度を算出でき、散乱光の強度から反射率を算出できる。

産業上の利用可能性

以上のように本発明の測定装置及び蛍光測定方法によれば、試料に複

数の色素、例えば蛍光色素が混合されている場合であっても、得られた透過光又は放射光（蛍光）の強度から色素毎の実際の強度を分離することができる。このため、本発明の測定装置及び蛍光測定方法を用いることで、従来よりも更に正確な成分分析や遺伝子診断等を行なうことが可

5 能となる。

## 請 求 の 範 囲

1. 複数の色素が混合された試料に波長の異なる光を照射したときの透過光又は放射光の強度を前記色素毎に測定する測定装置であって、

- 5 波長の異なる光を前記試料に照射可能な光源ユニットと、前記透過光又は前記放射光を受光し、受光した光の強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットと、演算部とを有し、

前記演算部は、

- 10 前記複数の色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって波長の異なる光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記透過光又は前記放射光の強度を前記色素毎に算出する測定装置。

- 15 2. 前記試料に、前記色素として励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合されており、

前記受光ユニットが、前記蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力し、

- 20 前記演算部が、前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する請求の範囲 1 記載の測定装置。

- 25 3. 前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に 1 ~ n の番号を付し、前記光源ユニットが k ( 1, 2, ..., n ) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号

の出力値を  $X_k$ 、前記  $k$  番の蛍光色素の蛍光強度を  $Y_k$  としたときに、前記補正係数が下記式 (23) を満たす行列 ( $a_{ij}$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ;  $j = 1, 2, \dots, n$ )) であり、

- 前記演算部は、下記式 (23) に前記行列 ( $a_{ij}$ ) と前記出力値  $X_1 \sim X_n$  とを代入して、前記蛍光強度  $Y_1 \sim Y_n$  を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出する請求の範囲 2 記載の測定装置。

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \dots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \dots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \dots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \dots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix} \quad \dots \dots \dots (23)$$

4. 前記光源ユニットが照射する光の光量を検出して前記演算部に信号を出力する光量モニタを有し、
- 10 前記演算部は、前記光量モニタが出力した信号に基づいて、前記出力値  $X_1 \sim X_n$  又は行列要素  $a_{11} \sim a_{nn}$  を補正する請求の範囲 3 記載の測定装置。
5. 波長の異なる光を照射可能な光源ユニットと、蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットとを用いて、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を測定する蛍光測定方法であって、
- 15 前記補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する工程を有し、
- 20 前記補正係数は、

前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて、算出されたもの

5 である蛍光測定方法。

6. 前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に1～nの番号を付し、前記光源ユニットがk(1, 2, …, n)番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を $X_k$ 、前記k番の蛍光色素の蛍光強度を $Y_k$ としたときに、前記補正係数が下記式(24)を満たす行列( $a_{ij}$ ( $i=1, 2, \dots, n$ ;  $j=1, 2, \dots, n$ ))であり、

下記式(24)に前記行列( $a_{ij}$ )と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出する請求の範囲5記載の蛍光測定方法。

15

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \dots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \dots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \dots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \dots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix} \quad \dots \dots \dots (24)$$

7. 前記光源ユニットが照射した光の光量に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正する請求の範囲6記載の蛍光測定方法。

20 8. 波長の異なる光を照射可能な光源ユニットと、蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受

光ユニットとを用いて、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度をコンピュータに測定させるプログラムであって、

- 5 補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の  
5 蛍光強度を算出するステップを有し、

前記補正係数は、

- 前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光  
色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニ  
10 ャットによって前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したと  
きに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて、算出されたもの  
であるプログラム。

9. 前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に 1 ~ n の番号を付し、  
前記光源ユニットが k ( 1, 2, ..., n ) 番の蛍光色素の励起波長の光  
を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号  
15 の出力値を  $X_k$ 、前記 k 番の蛍光色素の蛍光強度を  $Y_k$  としたときに、前  
記補正係数が下記式 ( 25 ) を満たす行列 (  $a_{ij}$  (  $i = 1, 2, \dots, n$  ;  
 $j = 1, 2, \dots, n$  ) ) であり、

- 下記式 ( 25 ) に前記行列 (  $a_{ij}$  ) と前記出力値  $X_1 \sim X_n$  とを代入  
して、前記蛍光強度  $Y_1 \sim Y_n$  を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出す  
20 る請求の範囲 8 記載のプログラム。

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \dots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \dots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \dots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \dots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix} \quad \dots \dots \dots (25)$$

10. 前記光源ユニットが照射した光の光量に基づいて前記出力値  $X_1 \sim X_n$  又は行列要素  $a_{11} \sim a_{nn}$  を補正する請求の範囲9記載のプログラム。

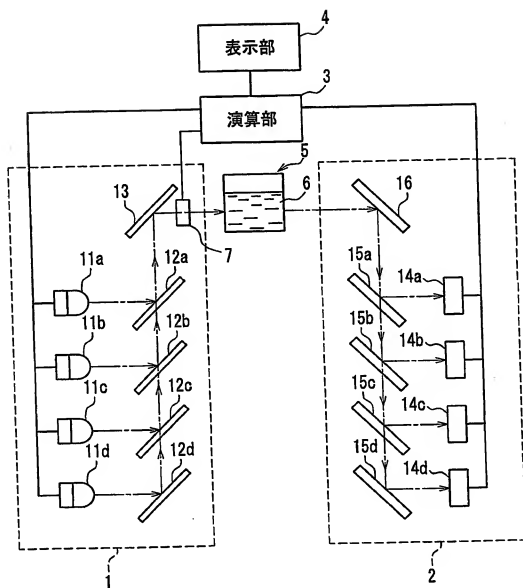


FIG. 1



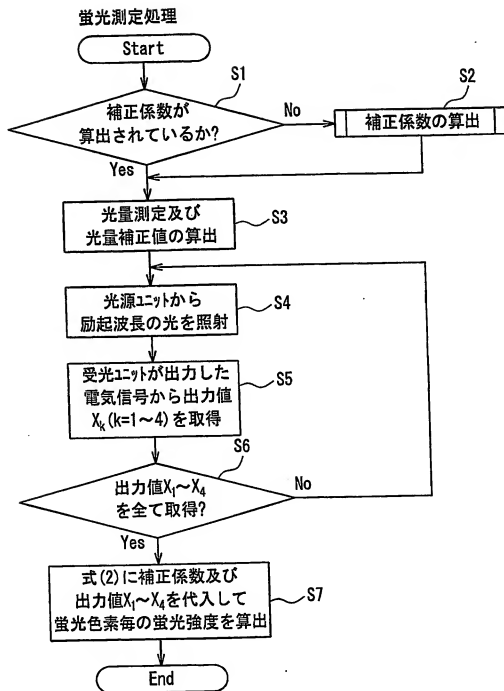


FIG. 2

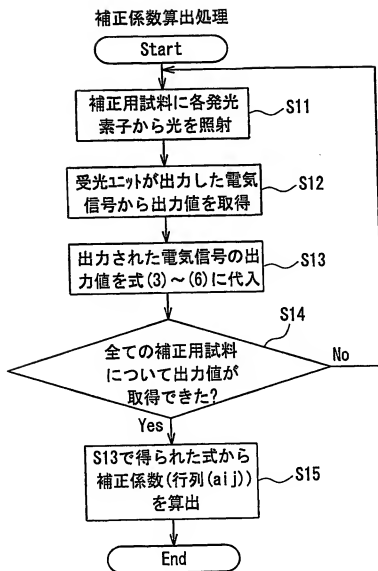


FIG. 3

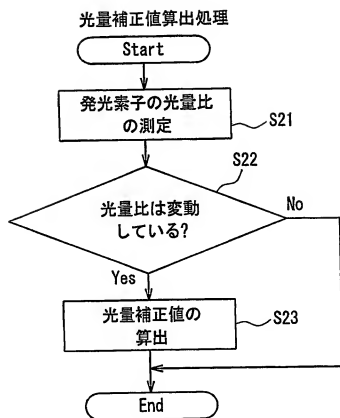


FIG. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14421

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N21/62-21/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0090630 A1 (Shimadzu Corp.),	1-3, 5, 6, 8, 9
Y	11 July, 2002 (11.07.02), Full text; Figs. 2 to 3 & JP 2002-168868 A Full text; Figs. 2 to 3	4, 7, 10
Y	JP 5-72039 A (Nikon Corp.), 23 March, 1993 (23.03.93), Par. No. [0028]; Fig. 4 (Family: none)	4, 7, 10
P, A	JP 2003-83894 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 19 March, 2003 (19.03.03), Full text; Figs. 1 to 13 (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
  - "E" earlier document but published on or after the international filing date
  - "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
  - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
  - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 January, 2004 (07.01.04)

Date of mailing of the international search report  
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N21/64

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N21/62-21/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 2002/0090630 A1 (Shimadzu Corporation)	1-3, 5, 6, 8, 9
Y	2002.07.11, 全文, 第2-3図 & JP 2002-168868 A, 全文, 第2-3図	4, 7, 10
Y	JP 5-72039 A (株式会社ニコン) 1993.03.23 段落番号【0028】、第4図 (ファミリーなし)	4, 7, 10
PA	JP 2003-83894 A (住友電気工業株式会社) 2003.03.19 全文, 第1-13図 (ファミリーなし)	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.01.04

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横井 直矢子

2W

9706

電話番号 03-3581-1101 内線 3290